Aus der Medizinischen Universitätsklinik in Marburg-Lahn
Direktor: Professor Dr. med. G. A. Martini

Histologische und histochemische Untersuchungen zur experimentellen Dünndarmschleimhautschädigung durch Triparanol (MER-29)

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Medizin
der hohen Medizinischen Fakultät
der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Renate Rosenbaum
aus Reichenberg

Marburg 1968

Fotodruck von Erich Mauersberger in Marburg

Aus der Medizinischen Universitätsklinik in Marburg-Lahn
Direktor: Professor Dr. med. G. A. Martini

Histologische und histochemische Untersuchungen zur experimentellen Dünndarmschleimhautschädigung durch Triparanol (MER-29)

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Medizin
der hohen Medizinischen Fakultät
der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Renate Rosenbaum
aus Reichenberg

Marburg 1968

Fotodruck von Erich Mauersberger in Marburg

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Angenommen von der Medizinischen Fakultät
der Universität Marburg am 18. Juni 1968

gedruckt mit Genehmigung der Fakultät
Dekan: Prof. Dr. med. R. Siegert
Referent: Doz. Dr. med. W. Dölle
Correferent: Prof. Dr. med. G.A. Martini

	Seite
E I N L E I T U N G	1
Aufgabe und Fragestellung	1
Triparanol - Struktur und Wirkung	4
Triparanol - Dünndarmveränderungen	6
D U R C H F Ü H R U N G D E S V E R S U C H S	8
Material	8
Methoden	9
Färbungen und histochemische Reaktionen	11
Enzymreaktionen	12
E R G E B N I S S E	16
Verlaufs- und Gewichtsprotokoll	16
Lupenbetrachtung	17
Histologische und histochemische Untersuchungen	17
Enzymhistochemische Untersuchungen	20
D I S K U S S I O N	30
Z U S A M M E N F A S S U N G	35
L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S	36

E I N L E I T U N G

Aufgabe und Fragestellung.

Bei der idiopathischen Sprue (synonym mit den Bezeichnungen: idiopathische Steatorrhoe und Glutenenteropathie), einer Dünndarmerkrankung unklarer Ursache, die durch Steatorrhoe und gestörte Resorption von Energieträgern, Mineralien und Vitaminen gekennzeichnet ist, treten morphologische Veränderungen der Dünndarmschleimhaut auf (Shiner und Doniach 1958). Sie bestehen in einem partiellen oder totalen Schwund der Zotten und gehen mit einer Erhöhung der Kryptenzone, die auf das zwei- bis dreifache verlängert sein kann, einher (Padykula, Strauss, Ladmann und Gardner 1961). Diese morphologischen Veränderungen galten zunächst als spezifische Läsion der Sprue (Booth, Stewart, Holmes und Brackenbury 1962).

Seit einigen Jahren mehren sich Beobachtungen von Zottenatrophien bei anderen intestinalen und auch bei extraintestinalen Erkrankungen (Amman 1965, Ottenjann 1966, Riecken, Stewart und Dowling 1966 b).

Neben den schweren morphologischen Störungen haben histochemische Untersuchungen tiefgreifende cytochemische Veränderungen der Dünndarmschleimhaut des Spruekranken aufgedeckt (Padykula et al. 1961). Weiterhin ist durch sie erst die typische zonale Umformung (Zottenreduktion, Erhöhung der Kryptenregion) klar erkennbar geworden.

Das Resorptionsepithel regeneriert sich in der Krypte, der sogenannten Germinativzone; die neugebildeten Epithelzellen wandern von dort innerhalb von Tagen zur Zottenspitze, um hier ins Darmlumen abgestoßen zu werden. Während der Wanderung der Zelle erfolgt ihre Ausdifferenzierung zur Resorptionszelle im Bereich des Kryptenmundes, so daß das Epithel der Zottenbasis funktionell und cytochemisch bereits weitgehend dem spitzennahen Zottenepithel entspricht (Padykula et al. 1961).

Bei der idiopathischen Sprue ist der Regenerationsvorgang stark beschleunigt und die Abstoßrate der Oberflächenzellen erhöht. Trotz der vermehrten Zellproliferation wird aber die gesteigerte Abstoßung nicht mehr kompensiert. So kommt es zur Zottenverkürzung und kompensatorisch zur Erhöhung der Germinativzone als Ausdruck des gestörten Gleichgewichts von Zellproliferation und Zellverlust. Der Mitoseindex erhöht sich auf das zwei- bis dreifache (Padykula et al. 1961). Der Vorgang führt zu der oben erwähnten Umformung der Schleimhaut; dabei entstehen aus der zweischichtig aufgebauten Schleimhaut drei Zonen (siehe Abb. 1, nach Padykula et al. 1961).

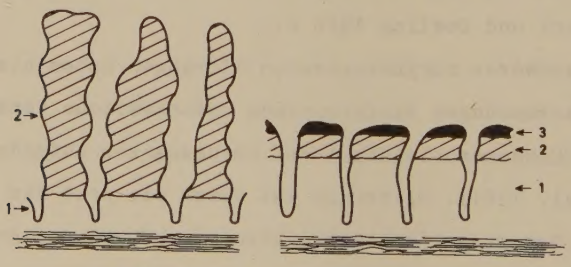


Abb.: 1

1 Zone mit Kryptenepithel
2 Zone mit normalem Zottenepithel
3 Zone mit verändertem Epithel

Histochemische Untersuchungen der Schleimhaut vor und während der Behandlung mit glutenfreier Nahrung haben gezeigt, daß neben der Zellregeneration auch die Bildung der Enzymaktivitäten in den geschädigten Oberflächenzellen gesteigert ist. So tritt eine normalerweise nicht vorhandene zweite Aktivitätszone der sauren Phosphatase in der Golgizone der Zellen auf, die Ausdruck einer gesteigerten Enzymbildung ist (Riecken und Pearse 1965). Auch andere histochemisch nachweisbare Enzyme zeigen eine Aktivierung (Riecken, Stewart, Booth und Pearse 1966a)

Zur Frage nach dem Entstehungsmechanismus der typischen cytochemischen und morphologischen Schleimhautveränderungen ist Sicheres nicht bekannt. Die auslösende Rolle bei der Schleimhautschädigung fällt dem in der Nahrung befindlichen Gluten, und zwar seiner alkohollöslichen Komponente, dem Gliadin, zu (Dicke 1950; Dicke, Weijers und v.d. Kamer 1953; v.d.Kamer, Weijers und Dicke 1953). Über seine Wirkungsweise herrscht jedoch Unklarheit. Antigen-Antikörper-Reaktion (Berger 1958) und das Fehlen eines peptidspaltenden Enzyms werden diskutiert (Gardner und Strauss 1960; Haemmerli 1966). Cytochemische Untersuchungen haben zum Nachweis eines Lysosomenschwundes mit vermehrter diffuser saurer Phosphatasereaktion im geschädigten Epithel geführt, Veränderungen, die nach Glutenentzug reversibel sind, Dieser Befund könnte auf eine besondere Bedeutung der Lysosomen bei der Ausformung der Schleimhauttransformation hinweisen (Riecken et al. 1966a).

Ausgehend von diesen Beobachtungen wurde an einem tierexperimentellen Modell das morphologische und cytochemische Verhalten der Dünndarmschleimhaut nach Schädigung durch den Cholesterinsynthesehemmer Triparanol überprüft. Die Anregung dazu gaben Berichte, nach denen diese Substanz sowohl bei Menschen als auch im Tierexperiment zur Ausbildung einer Zottenatrophie führt (Mc Pherson und Summerskill 1963, Mc Pherson und Shorter 1965).

Die Untersuchungen wurden unter folgende Fragen gestellt:

1. Läßt sich im Tierexperiment durch Triparanol eine der idiopathischen Sprue vergleichbare morphologische intestinale Läsion setzen?

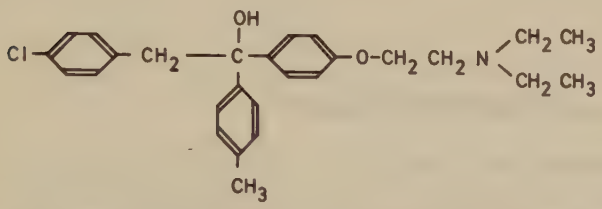
2. Welche cytochemischen Veränderungen sind dem morphologischen Bild zugeordnet?

3. Gibt es spezifische morphologische und/oder cytochemische Kriterien, die Rückschlüsse auf das schädigende Agens erlauben?

Triparanol - Struktur und Wirkung.

Palopoli und Mitarbeiter fanden bei der Synthese von Substanzen mit Östrogen- und östrogenantagonistischer Wirkung das Triparanol, das zur Senkung des Cholesterinspiegels führt (Palopoli 1959).

Für eine solche Substanz bestand seit langem in der Behandlung von Hypercholesterinämien ein Bedarf. 1960 kam das Triparanol in den USA, 1961 in der Bundesrepublik auf den Markt. Es mußte jedoch 1962 wegen toxischer Nebenwirkungen wieder aus dem Handel gezogen werden. In seiner Struktur ist das Triparanol dem Östrogenantagonisten Ethamoxytriphetol ähnlich. Es unterscheidet sich von diesem nur durch eine Methylgruppe anstelle eines Wasserstoffatoms am vierten C-Atom des zweiten Ringes und durch eine Chloridgruppe anstelle einer Methoxylgruppe; es hat die folgende Strukturformel:



Die Wirkung des Triparanol besteht in der Hemmung des letzten Schrittes der Cholesterinbiosynthese, der Umwandlung von Desmosterin (24-Dehydrocholesterin) in Cholesterin (Avignan, Steinberg, Thompsen und Mosettig 1959). In der Leber von Ratten, die Triparanol erhalten, häufen sich große Mengen Desmosterin an (Frantz, Mobberley und Schroepfer 1959). Radioaktiv markiertes Acetat wird von Ratten, die mit Triparanol behandelt werden, kaum zum Aufbau von Cholesterin verwendet, es wird zur Synthese anderer Steroide verbraucht. Ähnlich wird auch die Mevalonsäure nach Tripara-

nolgabe verstoffwechselt, während sie normalerweise zur Cholesterinsynthese herangezogen wird (Gould 1959). Im Serum kommt es bei Mensch und Ratte nach Triparanol zum Anstieg von Desmosterin und zur Senkung des Cholesterinspiegels (Leckert, Mc Hardy, Mc Hardy, Welch und Cradic 1959; Estes 1959; Todd 1959).

Beweise für eine Hemmung der Cholesterinresorption im Dünndarm konnten nicht erbracht werden (Gould 1959). Die Ausscheidung von Triparanol erfolgt über den Darm, weniger auch über die Nieren (Blohm, Kariya und Mac Kenzie 1959).

Triparanol - Dünndarmveränderungen.

Über die ernsten Nebenwirkungen des Triparanols am Intestinaltrakt berichteten Mc Pherson und Summerskill 1963. Sie beschrieben bei einem Patienten ein akutes Malabsorptionssyndrom mit reversibler Atrophie der Jejunumschleimhaut nach Triparanolgabe. Einen weiteren Fall veröffentlichten Mc Pherson und Shorter 1965:

> Eine 70-jährige Patientin war fünf Monate lang mit 250 mg Triparanol/d behandelt worden. Dann traten Diarrhoe, Erbrechen und Schwindel auf, die nach zweiwöchigem Absetzen verschwanden und bei erneuter Triparanolgabe wieder einsetzten. Die Jejunumbiopsie zeigte in diesem Fall nur plumpe Zotten und entzündliche Zellinfiltrate in der Lamina propria. Distale Abschnitte wurden nicht bioptisch untersucht.

Bei einer Nachuntersuchung dieser Befunde im Rattenexperiment wurden im histologischen Schnitt fokale Zottenatrophien beobachtet. Die stärksten Veränderungen fanden sich hierbei im Ileum; im Jejunum waren sie weniger deutlich (Mc Pherson und Shorter 1965). Histochemische Untersuchungen wurden von diesen Autoren nicht durchgeführt.

DURCHFÜHRUNG DES VERSUCHS

Material.

Der Versuch wurde mit 40 weiblichen weißen Wistar-Ratten einer Altersklasse angesetzt. Die Tiere wurden in vier Gruppen geteilt und in getrennten Käfigen gehalten. Alle hatten freien Zugang zum Trinkwasser und zum Futter, das aus Altromin-Standard-Kost bestand. In der ersten Versuchsreihe wurden täglich 50 mg Triparanol/kg Körpergewicht gegeben, in der zweiten Versuchsreihe 5 mg/kg. Die Ratten erhielten das in Maiskeimöl gelöste Triparanol durch die Schlundsonde. Die Konzentration der Triparanol-Maiskeimöl-Lösungen wurde so gewählt, daß die Menge in 10 ml Öl/kg Rattengewicht und Tag enthalten war. Als Kontrollen dienten 10 Ratten, denen die gleiche Menge Öl gegeben wurde. Eine weitere Kontrollgruppe von 10 Ratten erhielt nur die Altromin-Standard-Kost. Alle Tiere wurden jeden zweiten oder dritten Tag gewogen.

Der Versuchsansatz ist in Tabelle I dargestellt:

Zahl der Versuchstiere	applizierte Triparanolmenge(in Maiskeimöl gelöst) in mg/d + kg	Maiskeimölgefütterte Kontrolltiere	Altromin-Standard-Kost gefütterte Leer-Kontrolltiere	Behandlungsdauer in Tagen
5	5	3	2	14
5	5	2	3	21
4	50	2	2	7
2	50	1	1	9
2	50	1	1	11
2	50	1	1	16

Versuchsanordnung zur Frage der Dünndarmschleimhautveränderungen bei weiblichen Wistar-Ratten nach Triparanol-Applikation (durch die Schlundsonde)

Die Tiere wurden 18 bis 20 Stunden nach der letzten Sondierung getötet. Sie wurden oberflächlich mit Äther narkotisiert, dekapitiert und aus den Halsgefäßen entblutet. Der Dünndarm wurde rasch und unter Vermeidung von Zug freipräpariert, und sechs Gewebsproben wurden aus vier verschiedenen Darmabschnitten entnommen, jeweils 18 und 30 cm unterhalb des Pylorus sowie 9 und 4 cm oberhalb der Ileozökalklappe (s. Abb. 3).

P = Pylorus
J = Ileocoecalklappe
a = 18cm unterhalb des Pylorus
b = 30cm unterhalb des Pylorus
c = 9cm oberhalb der Ileocoecalklappe
d = 4cm oberhalb der Ileocoecalklappe

Abb. 3

Untersuchte Dünndarmabschnitte der Versuchstiere (Wistarratten)

Methoden.

In Vorversuchen waren optimale Fixierungs- und Reaktionsbedingungen für das untersuchte Material ermittelt worden. Dabei wurden auf Deckgläschen aufgezogene Schnitte verwandt, die zur Simultaninkubation größerer Schnittserien in Spezialküvetten (Columbia Jars) besonders geeignet sind.

Behandlung der frisch entnommenen Gewebsproben:

1. Ein Segment wurde zur Lupenbetrachtung und Photographie(Brackenbury und Stewart 1963) der Länge nach aufgetrennt, auf einem Objektträger ausgebreitet und in einer Petrischale mit physiologischer Kochsalzlösung überschichtet, so daß sich die Zotten frei aufrichten konnten. Photographiert wurde mit dem Aristaphot (Leitz).

2. Gefrierstopp. Ein Segment wurde unmittelbar nach der Entnahme in Lebergewebe desselben Tieres eingebettet, auf ein Korkplättchen gelegt und in flüssigem Stickstoff gefroren. Nach Verpackung in luftdichten Plastiksäckchen wurde das Material bis zur sumultanen Verarbeitung in der Kühltruhe bei -20°C gespeichert.

3. Formalin-Calcium-Fixierung. Ein Segment wurde in 4%-iger Formalin-Calcium-Lösung (Baker 1944) (16h,4°C) fixiert und anschließend in Gummi-arabicum-Zucker-Lösung (Holt 1960) bei 4°C gespeichert. Zur Schnittherstellung wurde das Material in eiskaltem destilliertem Wasser 30 Sekunden gespült (um den Zucker zu entfernen) und auf Korkplättchen montiert.

4. Glyceringelatine - Einbettung. Ein Segment wurde nach Formalin-Calcium-Fixierung in Glyzeringelatine eingebettet (Baker 1946). Hierzu wurden die Darmstücke 20 Stunden in 4%-igem Formalin-Calcium (4°C) fixiert und nach sechsstündigem Wässern in destilliertem Wasser 24 Stunden in einer 25%-igen Glyzeringelatinelösung mit

Phenolzusatz (0,25%) bei 37°C inkubiert. Die Einbettung selbst erfolgte in frischer Glyzeringelatinelösung, die in flache Glasschälchen ausgegossen wurde. Nach dem Erhärten im Kühlschrank wurde das Material in Würfel geschnitten, die in 4%-iger Formalin-Calcium-Lösung (4°C) aufbewahrt wurden.

5. Formalin-Fixierung. Ein Segment wurde zur Paraffineinbettung in 10%-igem Formalin (24 h) fixiert. Nach Dehydrierung über die Alkoholreihe und Klärung in Xylol erfolgte die Einbettung in Paraffin (Schmelzpunkt 56 bis 58°C).

6. Fixierung nach Carnoy. Ein Segment wurde 18 Stunden in Carnoy'scher Lösung fixiert (Romeis 1946). Weiterverarbeitung wie unter 5.

Die Paraffinblöcke wurden auf einem Schlittenmikrotom (Leitz), die Gewebsblöcke 1 bis 4 in einem Pearse-Kryostaten (12 bis 14 µ starke Schnitte) geschnitten. Das Gewebe der am gleichen Tage getöteten Tiere wurde simultan verarbeitet, die Schnitte jeweils im gleichen Medium inkubiert.

Färbungen und histochemische Reaktionen.

1. Haematoxylin-Eosin-Färbung (Romeis 1948).

2. Perjodsäure-Schiff-Reaktion (Mc Manus 1946).
Paraffinschnitte formalinfixierten Gewebes wurden verwandt.

3. Sudan-Schwarz-B-Färbung (Lison 1934).
Für diesen Versuch wurden frei schwimmende Kryostatschnitte der in Glyzeringelatine eingebetteten Darmstücke verwandt.

4. Methylgrün-Pyronin-Färbung (Brachet 1953).
Verwendung von Paraffinschnitten des nach Carnoy fixierten Materials. Färbedauer: 15 Minuten bei 56°C. Kurzes Eintauchen der Schnitte in Eiswasser. Abtupfen mit Filterpapier. Entwässerung über Aceton, Aceton mit 10%-igem Xylol, Aceton mit 50%-igem Xylol und reines Xylol. Einbettung in Eukitt.

Enzymreaktionen:

Es wurden Membranenzyme, Enzyme der Lysosomen, der Mitochondrien, des Golgiapparates und des endoplasmatischen Retikulums untersucht (s. Abb. 5). Alle Enzymnachweisreaktionen wurden an formalincalciumfixierten Kryostatschnitten durchgeführt, ausgenommen die Succinodehydrogenase- und die Leucylaminopeptidase-Reaktion, für die unfixierte Schnitte verwendet wurden.

1. Membranenzyme

a) Adenosintriphosphatase nach Wachstein und Meisel (1957); Substrat: Adenosin-5-Triphosphat, krist. di-Natriumsalz (Boehringer). Inkubationszeit: 25 Minuten bei 37°C.

b) Leucylaminopeptidase nach Nachlas, Crawford und Seligman (1957); Material: unfixierte, mit eiskaltem Aceton extrahierte Kryostatschnitte. Substrat: L-Leucyl-ß-Naphtylamid-HCL. Kuppler: Fast Blue B Salt (tetrazotiertes di-o-Anisidin. $ZnCl_2$). Inkubationszeit: 15 Minuten bei Zimmertemperatur.

c) Unspezifische alkalische Phosphatase nach Burstone (1958); Substrat: α-Naphthol-ASBI-Phosphat (Sigma). Kuppler: Brentamine Fast Red TR Salt (4-Chloro-o-Toluidin). Inkubationszeit: 45 Minuten bei 37°C.

2. Lysosomale Enzyme

a) ß-Glucosaminidase nach Pugh und Walker (1961); Substrat: α-Naphthol-ASLC-N-Acetyl-ß-D-Glukosamin (Sigma). Kuppler: Brentamine Fast Garnett GBC Salt (o-Aminoazotoluendiazoniumsulfat). Inkubationszeit: 30 Minuten bei 37°C.

b) ß-Glucosaminidase nach Hayashi (1965). Substrat: wie bei a). Kuppler: Hexazonium-Pararosanilin (Williams und Hopkins). Inkubationszeit: 20 Minuten bei 37°C.

c) Saure Phosphatase nach Barka und Anderson (1962);

Substrat: α-Naphthol-ASBI-Phosphat (Sigma). Kuppler: Hexazonium-Pararosanilin.

3. Mitochondrienenzyme

a) Succinodehydrogenase nach Nachlas, Tsou, de Souza, Cheng und Seligman (1957); Material: unfixierte Schnitte. Substrat: Natriumsuccinat. Elektronenacceptor: Tetra Nitro Blue Tetrazoliumchloride (TNBT), (Nutritional Biochemicals Corporation). Inkubationszeit: 12 Minuten bei 37°C. Anschließend Acetonextraktion.

b) NAD-H- und NALP-H-Reduktase nach Scarpelli, Hess und Pearse (1958); Substrate: reduziertes Nicotinamid-adenin-dinucleotid, Natriumsalz (Boehringer) bzw. reduziertes Nicotinamid-adenin-dinucleotidphosphat, Tetranatriumsalz (Boehringer). Elektronenacceptor: Tetra Nitro Blue Tetrazoliumchloride (TNBT), (Nutritional Biochemicals Corporation). Inkubationszeit: 40 bzw. 70 Minuten bei 37°C.

4. Golgi-Marker

Thiaminpyrophosphatase nach Novikoff und Goldfischer (1961); Substrat: Cocarboxylase-tetrahydrat (EAG-Chemie, Keppler & Reif). Inkubationszeit: 40 Minuten bei 37°C.

5. Mikrosomale Aktivitäten

Thioacetessigsäure-Esterase nach Barrnett (1962); 0,125 ml Thioacetessigsäure wurden mit 1 N Natronlauge

bis zum pH 7,2 - 7,4 titriert. Mit 0,05M Cacodylatpuffer von pH 7,2 - 7,4 wurde auf 10 ml aufgefüllt. Unmittelbar vor Gebrauch wurden 5 ml 0,05M Cacodylatpuffer von pH 7,2 - 7,4 mit 48 mg Bleinitrat langsam dazugegeben. Nach zweimaligem Filtrieren Inkubation der Schnitte in diesem Medium (30 Minuten bei 4°C).

Kontrolluntersuchungen:

Zur Überprüfung der Spezifität der Enzymreaktionen dienten Substratauslassung bei der Inkubation und Hitzeinaktivierung von Kontrollschnitten (30 Minuten bei 90°C), im Falle der unspezifischen sauren Phosphatase außerdem Hemmung mit 0,02M NaF (10 Minuten).

E R G E B N I S S E

Verlaufs- und Gewichtsprotokoll.

Das Triparanol führte bei den Versuchstieren zu einer Gewichtsreduktion, die um den 8. und 9. Tag das Maximum erreichte. Die Tiere zeigten zu diesem Zeitpunkt eine auffällige Bewegungsarmut und wirkten schwer krank. Nach zweitägiger Unterbrechung der Triparanolgaben konnte die Behandlung bis zum festgesetzten Termin fortgesetzt werden. Dabei verhielten sich die zwei Versuchsreihen weitgehend gleich. Die Tiere erholten sich wieder und erreichten am Tötungstermin einen den Kontrollen ähnlichen Gewichtskurvenverlauf. DieGewichtskurven der Versuchstiere und inrer Kontrollen sind in Abb. 4 wiedergegeben. Stuhlveränderungen wurden während der gesamten Behandlungsphase nicht beobachtet.

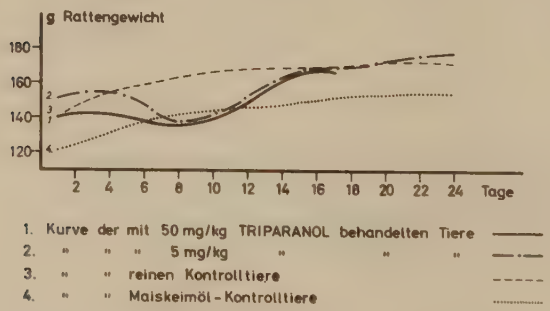


Abb.: 4

Kurven der mittleren Gewichte der mit TRIPARANOL behandelten Ratten und der Kontrolltiere

Lupenbetrachtung.

Bei Lupenbetrachtung war das Zottenbild in den vier untersuchten Abschnitten (a bis d) der mit Triparanol behandelten Tiere dem der entsprechenden Abschnitte der Kontrolltiere weitgehend ähnlich. In den oberen Abschnitten waren die Zotten blattförmig und relativ breitbasig. In den distalen Abschnitten waren sie flacher und gleichmäßiger geformt als proximal. Durch ihre gedrängte und gleichmäßige Anordnung entstand hier ein fischzugartiges Bild. Der Zottenrasen der behandelten Tiere ließ aber unscharf begrenzte Bezirke erkennen, in denen die Zotten plumper und in der Anordnung unregelmäßiger waren, das Kapillarnetz stärker hervortrat oder eine deutliche Schleimdecke über den Zotten lag. Zottenverkürzungen im Sinne von generalisierten oder umschriebenen Zottenatrophien wurden bei den Versuchstieren lupenmikroskopisch nicht beobachtet. Die mit 5 mg/kg Triparanol/d behandelten Ratten zeigten dieselben geringgradigen Schleimhautveränderungen wie die Tiere der ersten Versuchsreihe.

Histologische und histochemische Untersuchungen.

Der morphologische Befund im histologischen Präparat entsprach dem lupenmikroskopischen Bild weitgehend. Die Veränderungen bei der mit Triparanol behandelten Tiergruppe

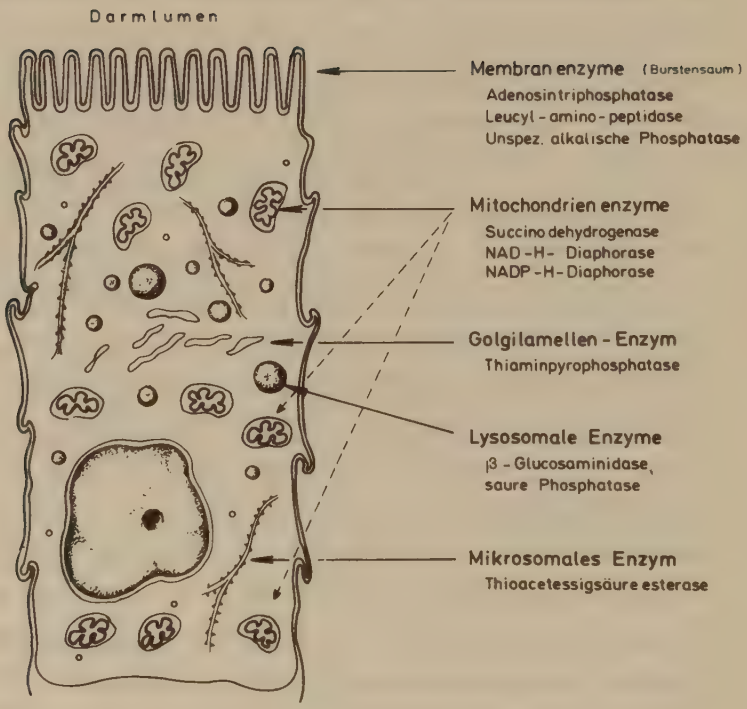


Abb.: 5

Lokalisation der untersuchten Enzyme in der Resorptionszelle des Rattendünndarms

waren gegenüber den Kontrollgruppen minimal.

Die HE-Schnitte der behandelten Tiere ließen bei der Durchmusterung mit der Übersichtsvergrößerung keine eindeutigen Veränderungen der Zottengestalt, Zottenhöhe und Schleimhautstärke erkennen. Bei stärkerer Vergrößerung schien die Höhe des Resorptionsepithels jedoch bei einigen Tieren vermindert. Der Bürstensaum war häufiger vom Epithel abgehoben, das Epithel selbst erschien insgesamt vermehrt lädierbar. Unterhalb des Resorptionsepithels fiel die stärkere Blutfülle in den subepithelialen Randkapillaren auf, und das Zottenstroma ließ eine Vermehrung von Makrophagen und Rundzellen erkennen.

Die PAS-Reaktion, mit der die mukopolysaccharidhaltigen Strukturen dargestellt werden, führte bei den Kontrolltieren zu einer scharfen Markierung von Bürstensaum und Becherzellen. Bei den Versuchstieren ragten ausgefranste Teile des Bürstensaumes ins Darmlumen. Die Becherzellen zeigten in Form und Zahl keine Abweichungen.

Nach Anfärbung der Schnitte mit Sudan-Schwarz-B fand sich bei den Kontrolltieren eine feinkörnige graublaue Darstellung des Resorptionsepithels; die supranukleare Golgizone trat deutlicher hervor. Nach Triparanolbehandlung fiel dagegen die feingranuläre Tönung des Resorptionsepithels wesentlich schwächer aus, während sich die Golgizone intensiver färbte (s. Abb. 6). Vorherige Fettextraktion der Schnitte führte zu keiner Änderung dieses Färbungsergebnisses. Mit der Methylgrün-Pyronin-Färbung, die eine Dar-

stellung von DNS und RNS erlaubt, wurden in den normalen Präparaten die Kerne intensiv grün und das Plasma im gesamten Schnitt gleichmäßig blaß rosa angefärbt. Bei einzelnen Versuchstieren führte diese Färbung zu einer gering verstärkten Pyroninophilie der Kryptenzellen.

Enzymhistochemische Untersuchungen.

Diesen sehr diskreten morphologischen und histologischen Unterschieden stehen eindeutigere enzymhistochemische Veränderungen gegenüber.

Membranenzyme: bei den Kontrolltieren zeigten alle Reaktionen dieser Gruppe eine deutliche Darstellung des an das Darmlumen grenzenden Bürstensaumes des Resorptionsepithels. Nach Triparanolbehandlung war die ATPase-Aktivität in der Regel in allen Darmabschnitten herabgesetzt. In der Golgiregion oberhalb der Kernreihe wurden andererseits erst nach Triparanolbehandlung ATPase-positive Granula sichtbar (s. Abb. 7). Die Leucylamino-peptidase war in einigen Zotten vermindert; dieser Befund war jedoch inkonstant (s. Abb. 8). Die unspezifische alkalische Phosphatase-Reaktion zeigte ähnlich wie die ATPase-Reaktion bei den Triparanoltieren einen Aktivitätsschwund. In den proximalen Abschnitten waren diese Veränderungen geringer ausgeprägt als in den distalen. Hier fehlte oft jede Aktivität, während proximal auch Abschnitte mit unveränderter Aktivität gesehen wurden. Die Golzone

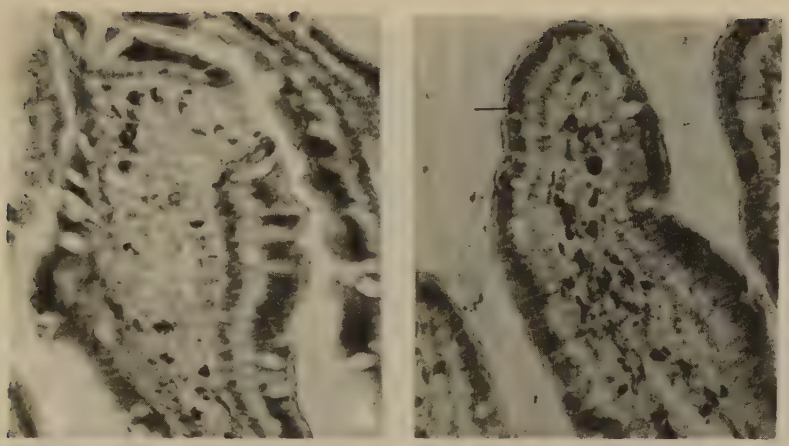


Abb. 6 Sudan-Schwarz-B-Färbung. Zotten gleicher Jejunumabschnitte einer Kontrollratte (links) und einer mit Triparanol behandelten Ratte (rechts). Nach Triparanol Auftreten grober Granula in der Golgizone oberhalb der Zellkerne des Schleimhautepithels (Pfeil).

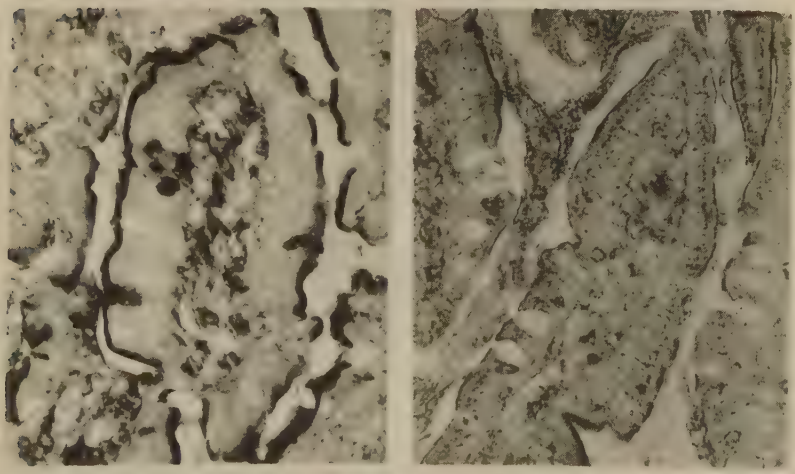


Abb. 7 ATPase-Reaktion. Kontrolltier (links) und behandeltes Tier (rechts).Schwund der Bürstensaumaktivität und Hervortreten der Golgizone durch ein körniges Reaktionsprodukt nach Triparanol.

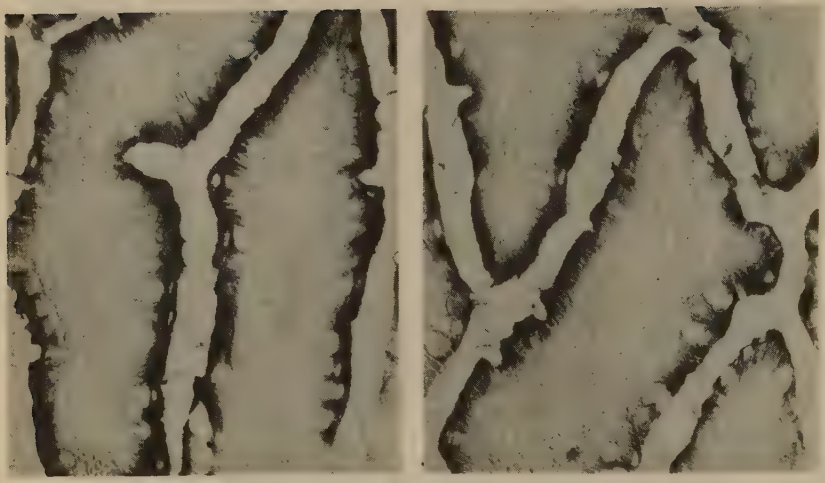


Abb. 8 Leucylaminopeptidase-Reaktion. Simultaninkubierte Schnitte einander entsprechender Jejunumabschnitte einer Kontroll- (links) und einer mit Triparanol behandelten (rechts) Ratte. Reduktion der Aktivität nach Triparanol.

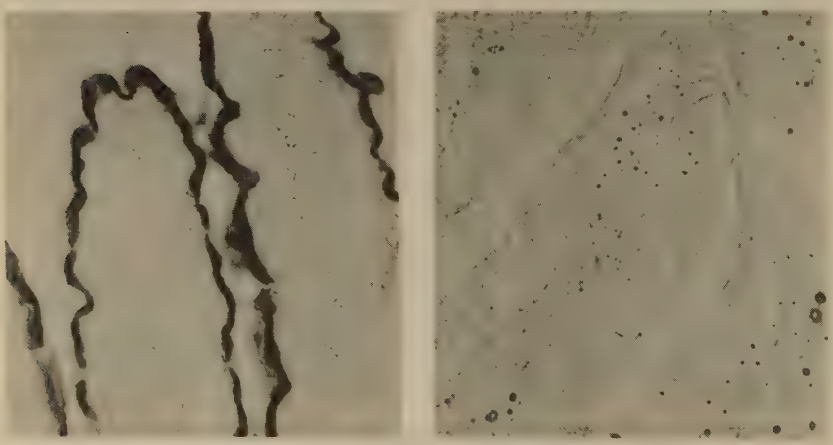


Abb. 9 Unspezifische alkalische Phosphatase. Kontrolltier (links) und behandeltes Tier (rechts). Fehlende Anfärbung des Bürstensaumes nach Behandlung mit Triparanol.

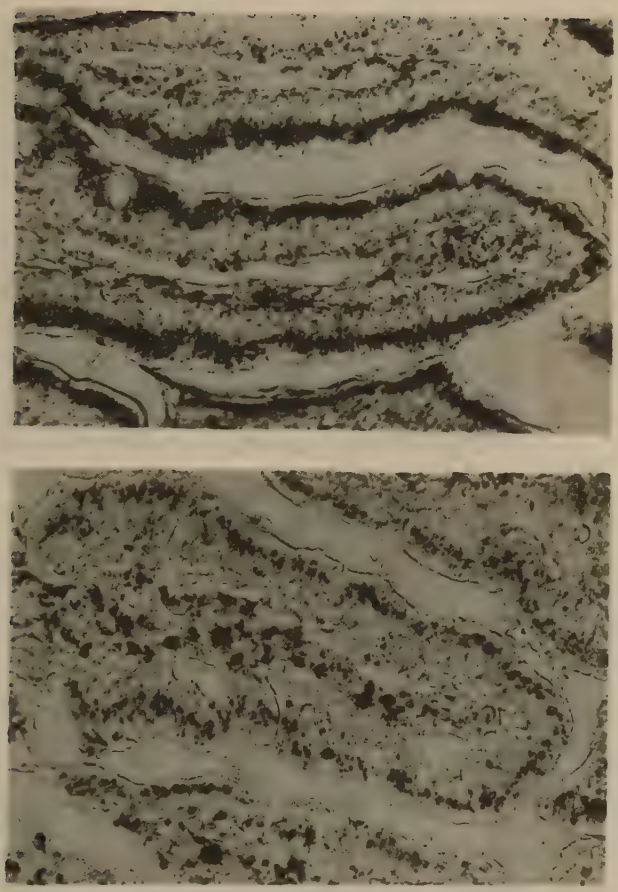


Abb. 10 ß-Glucosaminidase (Pugh und Walker 1961). Aktivität in dichten feinen Granula des Schleimhautepithels eines Kontrolltieres (oben). Schwund der "markierten" Granula im Resorptionsepithel des entsprechenden Jejunumabschnittes nach Triparanolbehandlung (unten).

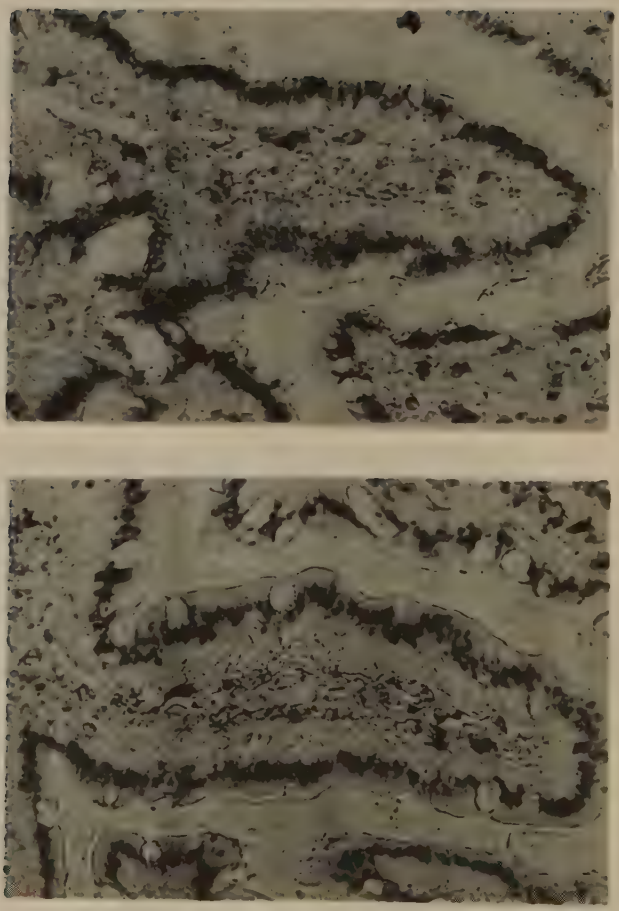


Abb. 11 ß-Glucosaminidase (Hayashi 1965). Einander entsprechende Jejunumabschnitte eines Kontrolltieres (oben) und eines behandelten Tieres (unten). Grobe Granula oberhalb der Kernzone nach Triparanolgabe.

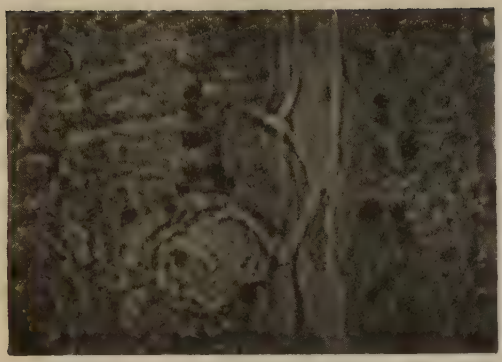


Abb. 12 ß-Glucosaminidase (Pugh und Walker 1961). Resorptionsepithel (stark vergrößert) einer mit Triparanol behandelten Ratte: Anordnung der "markierten" lysosomalen Granula in Doppelreihe oberhalb der Kernzone (Golgiregion).

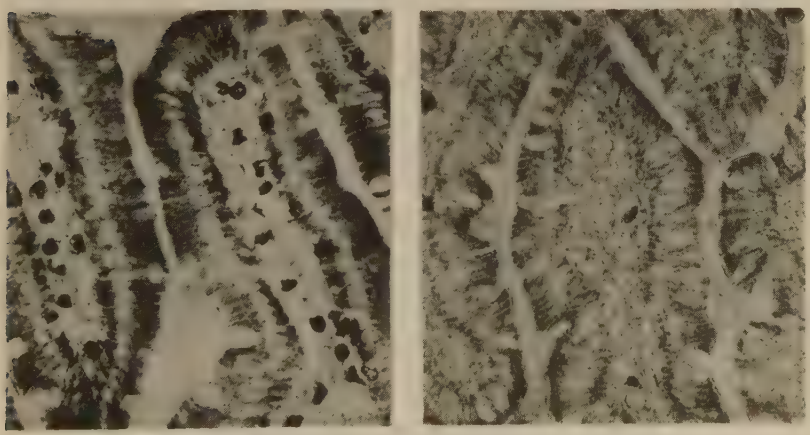


Abb. 13 NADP-H-Reduktase. Einander entsprechende Jejunumabschnitte eines Kontrolltieres (links) und eines behandelten Tieres (rechts). Schwächere NADP-H-Reduktase-Aktivität im Schleimhautepithel des mit Triparanol behandelten Tieres.

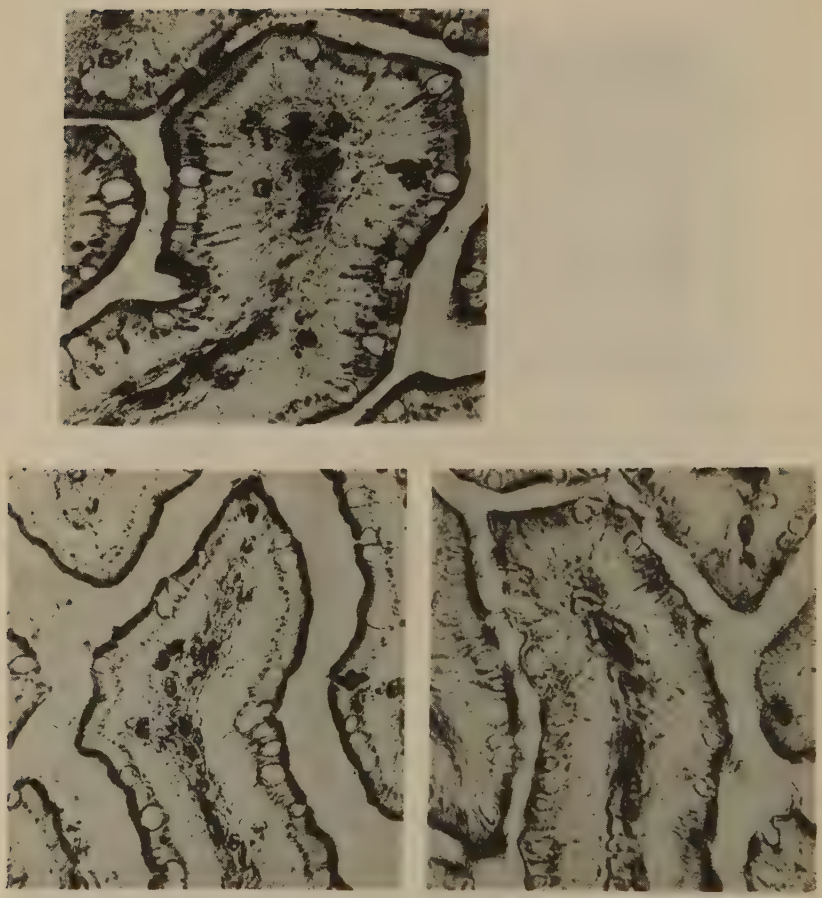


Abb. 14 Thiaminpyrophosphatase. Zotten einander entsprechender Jejunumabschnitte eines Kontrolltieres (oben) und eines mit Triparanol behandelten Tieres (unten). Nach Behandlung mit Triparanol in einigen Zotten abgeschwächte, in anderen fenlende Darstellung der Golgizone.

färbte sich bei dieser Reaktion mit an; sie reagierte nach Triparanolbehandlung stärker als bei den Kontrolltieren (s. Abb. 9).

Lysosomale Enzyme: diese Aktivitäten waren im normalen Resorptionsepithel in kleinen Granula lokalisiert, die überwiegend oberhalb der Kerne eine dichte Zone bildeten, aber auch im übrigen Plasma zu finden waren. Der ß-Glucosaminidasenachweis mit den oben angeführten Methoden führte zu gleichsinnigen Ergebnissen. Die Aktivitätszone war bei den behandelten Tieren schmaler. Die Granula waren gröber und in einer oder in zwei Reihen angeordnet, ihre Zahl war deutlich herabgesetzt. Diese Veränderungen waren sehr konstant. In den distalen Abschnitten waren sie weniger deutlich ausgeprägt. Sie traten am deutlichsten in den proximalen Dünndarmabschnitten (a und b) der mit 50 mg Triparanol/kg/d behandelten Tiere hervor (s. Abb. 10, 11 und 12). Die saure Phosphatasereaktion ergab einen der ß-Glucosaminidase entsprechenden Befund: Schwund der granulären Aktivität, Schwellung der in der Golgizone liegenden Granula. Am deutlichsten traten die Veränderungen auch hier in den proximalen Abschnitten des Dünndarms hervor. Neben der granulären Aktivität fand sich bei den Kontrolltieren auch eine diffuse Reaktion, die bei den Triparanoltieren vermindert war.

Mitochondrien-Enzyme: die mit den Mitochondrien assoziierten Aktivitäten Succinodehydrogenase und NAD-H- und NADP-H-Re-

duktase (s. Abb. 13) ließen im normalen Resorptionsepithel drei Aktivitätszonen erkennen, die durch die enzymfreien Regionen des Golgiapparates und des Kerns zustande kamen. Nach Triparanolbehandlung wurden lediglich inkonstante Aktivitätsverminderungen gesehen. Einzelne Abschnitte zeigten andererseits eine Steigerung der Succinodehydrogenaseaktivität.

Golgilamellen-Enzym: der Thiaminpyrophosphatase-Nachweis führte bei den Kontrolltieren zu einer intensiven Markierung der Golgiregion, die sich wie Perlen einer Kette in der supranuclearen Zone aufreihten. Bei den Testtieren zeigte diese Reaktion im allgemeinen eine geringere Aktivität. Neben Zotten, deren Epithelien keine Golgigranula erkennen ließen, fanden sich im gleichen Präparat solche, die noch eine deutliche Golgizonenreaktion aufwiesen (s. Abb. 14).

Mikrosomales Enzym: das normale Enzymmuster der unspezifischen Esterase zeigte bei der Thioacetessigsäure-Esterase-Reaktion eine diffuse Anfärbung des gesamten Zellplasmas mit einem Maximum im apikalen Bereich. Diese diffuse Reaktion war nach Triparanolbehandlung deutlich abgeschwächt.

Tabelle II.

Tabellarische Darstellung der enzymhistochemischen Veränderungen im Resorptionsepithel des Rattendünndarms nach Triparanolgabe.

	Norm. Aktivität	Triparanoleffekt
1. Membranenzyme		
Adenosintriphosphatase	++++	+++
Leucylaminopeptidase	++++	+++
Unsp. alkal. Phosphatase	++++	++
2. Lysosomale Enzyme		
ß-Glucosaminidase	++++	+
Saure Phosphatase	++++	++
3. Mitochondrienenzyme		
Succinodehydrogenase	++++	+++
NAD-H-Reduktase	++++	+++
NADP-H-Reduktase	++++	+++
4. Golgi-Marker		
Thiaminpyrophosphatase	++++	++
5. Mikrosomale Enzyme		
Thioacetessigsäure-Esterase	++++	+++

Zeichenerklärung:

++++ normale Aktivität der Kontrolltiere
+++ gering abgeschwächte Aktivität
++ stärker abgeschwächte Aktivität
+ sehr starke Verminderung der Aktivität

D I S K U S S I O N

Abweichend von den tierexperimentellen Untersuchungen Mc Pherson's und Shorter's (1965) konnten trotz gleicher Bedingungen bei den Ratten dieses Versuches gröbere morphologische Veränderungen im Sinne von fokalen Zottenatrophien nicht beobachtet werden. Da Irrtümer bei der alleinigen histologischen Beurteilung der Dünndarmschleimhaut möglich sind, wurde das Material auch lupenmikroskopisch untersucht. Faltige Aufwerfungen einer atrophierten Schleimhaut können bei rechtwinkliger Schnittführung zur Längsachse der Darmwand als plumpe Zotten fehlgedeutet werden. Die Lupenmikroskopie erleichtert in solchen Fällen die richtige Beurteilung (Booth, Stewart, Holmes und Brackenbury 1962). Sie gestattet weiterhin, größere Schleimhautbezirke rasch zu überblicken, und fokale Zottenatrophien zu entdecken, die bei ungünstiger Schnittführung im histologischen Präparat nicht zur Darstellung kommen. Auch mit Hilfe dieser beiden Untersuchungsmethoden gelang es nicht, Zottenatrophien nachzuweisen. Eine Zonenverschiebung von Zotten- und Kryptenregion entsprechend der bei der idiopathischen Sprue beobachteten Schleimhauttransformation war - wie bei dem Fehlen einer Zottenatrophie nicht anders zu erwarten - ebenfalls nicht ausgebildet. Die geringfügigen histologischen Veränderungen am Resorptionsepithel und Zottenstroma, vor allem aber die deutlichen Störungen des Enzymmusters weisen andererseits darauf hin, daß die Dünndarmschleimhaut durch das Triparanol beeinträchtigt wird.

Das Aktivitätsmuster der normalen Resorptionszelle gibt, wie ein Vergleich mit elektronenmikroskopischen Aufnahmen des Dünndarmepithels der Ratte zeigt (Palay und Karlin 1959), zugleich das Verteilungsbild der mit den jeweiligen Enzymen assoziierten Organellen im Zellraum wieder (s. auch Abb. 5). Histochemische Veränderungen des Enzymmusters zeigen folglich gleichzeitig Störungen in bestimmten Zellabschnitten an.

Nach Triparanol kam es generell zu einer Verminderung der untersuchten Enzymaktivitäten, die allerdings sehr unterschiedlich ausgeprägt und nur im Fall der lysosomalen Enzyme hochgradig war. Die Cytoarchitektur blieb dabei bis auf eine Verringerung der Lysosomenzahl und eine Schwellung der restlichen lysosomalen Granula erhalten. Diese Restgranula richteten sich in der Golgizone oberhalb der Kerne aus und wurden hier häufig in einer Doppelreihe angetroffen.

Beim Vergleich dieser cytochemischen Befunde des Resorptionsepithels mit den Veränderungen bei der menschlichen Sprue finden sich einige Parallelen:

1. Auch bei der Sprue kommt es zur Reduktion sämtlicher Enzymaktivitäten, die je nach der Ausprägung der Zottenatrophie hochgradig oder geringgradig ist.

2. Die im menschlichenResorptionsepithel normalerweise unterhalb des Bürstensaumes angeordneten Lysosomen schwinden auch bei der unbehandelten idiopathischen Steatorrhoe.

3. In weniger ausgeprägten Fällen, vor allem aber während der Rückbildung der Veränderungen unter glutenfreier Kost, kommt es zum Auftreten einer doppelten Aktivitätszone durch Ausbildung einer zweiten Lysosomenfront in der Golgizone.

Trotz dieser Gemeinsamkeiten besteht ein entscheidender Unterschied: Die typische Transformation der Glutenenteropathieschleimhaut, die Zonenverschiebung von Zotten- und Kryptenregion, bleibt aus, d.h., es fehlt die tiefgreifende Störung der Zellkinetik, die für dieses Krankheitsbild charakteristisch ist.

Die durch Triparanol induzierten enzymhistochemischen Veränderungen des Resorptionsepithels weisen aber darauf hin, daß die Noxe ebenso wie bei der Sprue alle Zellabschnitte des Resorptionsepithels erfaßt. Auf Grund seines Hemmeffektes auf die Cholesterinsynthese ist ein Angriff des Triparanols an den Lipoproteidmembranen der Zelle und dadurch eine Beeinträchtigung der mit ihnen assoziierten und histochemisch nachweisbaren Enzyme wahrscheinlich. Die sehr deutlichen Veränderungen der lysosomalen Enzymaktivitäten geben möglicherweise lediglich einen Hinweis auf die besondere Empfindlichkeit der Lysosomenmembran , deren hohe Verletzbarkeit experimentell erwiesen ist (Wattiaux und de Duve 1956; de Duve 1963; Dingle 1963; Novikoff 1963). Die Anordnung der noch angetroffenen lysosomalen Granula in der Golgiregion unterstreicht die am Resorptionsepithel des Dünndarms und

an anderen Zellen nachgewiesenen funktionellen Beziehungen zwischen Lysosomen und Golgiapparat: die Lysosomen werden im Golgiapparat gebildet (Novikoff 1963). Anders als bei der Glutenenteropathie des Menschen liegt aber bei der Ratte das Maximum der Lysosomen im normalen Resorptionsepithel bereits in der Golgiregion; die wenigen großen und geschwollenen Formen nach Triparanol lassen jedoch eher an eine Bildungsstörung denken als an eine gesteigerte Regeneration. Eine solche findet sich aber bei der idiopathischen Sprue (Padykula et al. 1961). Phänotypisch besteht daher eine gewisse Ähnlichkeit der cytochemischen Bilder der Dünndarmresorptionszelle von Spruepatienten und von Triparanol-behandelten Ratten, hinter denen sich unterschiedliche Mechanismen verbergen.

Zu den eingangs gestellten Fragen wird abschließend festgestellt:

1. Morphologische Dünndarmschleimhautveränderungen im Sinne der Zottenatrophie wurden unter den Bedingungen des Versuches bei der Ratte nicht erzielt.

2. Die cytochemischen Veränderungen am Resorptionsepithel nach Triparanol ähneln insofern denen der menschlichen Sprue, als es histochemisch zu einer alle untersuchten Enzyme betreffenden Aktivitätsminderung und zu ähnlichen lysosomalen Veränderungen kommt. Formalgenetisch ist eine Störung der Zellmembranen und der mit ihnen assoziierten Enzyme wahrscheinlich. Während sich bei der idiopathischen

Steatorrhoe Hinweise auf eine gesteigerte Regeneration finden, fehlen diese in den Dünndarmresorptionszellen der triparanolgeschädigten Ratte.

3. Rückschlüsse auf das schädigende Agens konnten aus den cytochemischen Phänomenen nicht gezogen werden.

Z U S A M M E N F A S S U N G

Es wurde die Wirkung von Triparanol (MER-29), einem Cholesterinsynthesehemmer, auf die Dünndarmschleimhaut von Ratten mit lupenmikroskopischen, histologischen und histochemischen Methoden untersucht und mit den Befunden bei der idiopathischen Steatorrhoe des Menschen verglichen.

In zwei Versuchsreihen wurden Ratten mit 5 bzw. 50 mg/kg Körpergewicht/d des in Maiskeimöl gelösten Triparanols oral ein bis drei Wochen lang belastet. Als Kontrollen dienten mit reinem Maiskeimöl sondierte Ratten und Leertiere, die nur Altrominstandardkost erhalten hatten.

Gröbere morphologische Veränderungen im Sinne von Zottenatrophien konnten nicht gefunden werden. Die untersuchten Enzymaktivitäten zeigten jedoch eine Verminderung unterschiedlicher Ausprägung. Am deutlichsten waren die lysosomalen Aktivitäten vermindert. Eine Schwellung der noch durch die histochemischen Enzymreaktionen "markierbaren" lysosomalen Granula wies weiterhin auf morphologische Veränderungen der Lysosomen hin. Phänotypisch zeigten diese histochemischen Bilder Ähnlichkeit mit den Veränderungen bei der idiopathischen Steatorrhoe des Menschen.

L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

Amman, R., Celiac and celiac-like mucosal changes of the small intestine.
Gastroenterologia (Basel), 103, S. 295-307, 1965

Avignan, J., D. Steinberg, M.J. Thompsen, and E. Mosettig, The mechanism of action of MER-29.
In: Progress in cardiovascular diseases. Proceedings of the conference on MER-29 (Triparanol), Princeton, New Jersey, December 16-17, 1959, edited by C.K. Friedberg, Vol.II, No.6 (Part I), 525-530, Grune and Stratton (New York) 1960.

Baker, J.R., The structure and chemical composition of the golgi element.
Quarterly Journal of Microscopical Science, 85/I, 1-71, 1944.

- , The histochemical recognition of lipine.
Quarterly Journal of Microscopical Science, 87/IV, 441-470, 1946.

Barka, T. and P.J. Anderson, Histochemical methods for acid phosphatase using hexazonium pararosaniline as coupler.
Journal of Histochemistry and Cytochemistry 10, 741-753, 1962.

- , Histochemistry: Theory, Practice, and Bibliography, Hoeber Medical Division, New York-Evanston-London 1963.

Barrnett, R.J., The fine structural lokalization of azetylcholinesterase at the myoneural junction.
Journal of Cell Biology 12, 247-262, 1962.

Berger, E., Zur allergischen Pathogenese der Cöliakie.
Bibliotheca Paediatrica, Basel 67, 1-55, 1958.

Blohm, T.R., T. Kariya, and R.D. MacKenzie, Excretory products of the sterol biosynthetic pathway in the MER-29 rat. Excretion of MER-29.
In: Progress in cardiovascular diseases. Proceedings of the conference on MER-29 (Triparanol), Princeton, New Jersey, December 16-17, 1959, edited by C.K. Friedberg, Vol.II, No.6 (Part I), 519-523, Grune and Stratton (New York) 1960.

Booth, C.C., J.S. Stewart, R. Holmes, and W. Brackenbury, Dissection microscope appearences of intestinal mucosa.
In: Intestinal Biopsy (Ciba Foundation Study Group No.14), 2-19, edited by G.E.W. Wolstenholme and M.P. Cameron, J. & A. Churchill,(London) 1962.

Brachet, J., The use of basic dyes and ribonuclease for the cytochemical detection of ribionucleic acid.
Quarterly Journal of Microsopical Science 94/I, 1-10, 1953.

Brackenbury, W. and J.S. Stewart, Macroscopic appearances of mucosal biopsies from the small intestine.
Medical and Biological Illustration 13, 220-227, 1963.

Burstone, M.S., Histochemical comparison of naphtol-AS-phosphates for the demonstration of phosphatases.
Journal of the National Cancer Institute 20, 601-615, 1958.

Culling, C.F.A., Handbook of histopathological techniques.
2. ed., Butterworth (London) 1963.

De Duve, C., The lysosome concept.
In: Lysosomes (Ciba Foundation Symposium), 1-31, J. and A. Churchill (London) 1963.

Dicke, W.K., Coeliac disease. Investigation of the harmful effects of certain types of cereal on patients with coeliac disease.
Thesis (Utrecht) 1950.

- , H.A. Weijers and J.H. van de Kamer, Coeliac disease: II. The presence in wheat of a factor having a deleterious effect in cases of coeliac disease.
Acta paediatrica (Stockholm) 42, 34-42, 1953.

Estes, J.E., Clinical experience with MER-29, an inhibitor of cholesterol synthesis.
In: Progress in cardiovascular diseases. Proceedings of the conference on MER-29 (Triparanol), Princeton, New Jersey, December 16-17, 1959, edited by C.K. Friedberg, Vol.II, No.6 (Part I), 564-570, Grune and Stratton (New York) 1960.

Frantz, I.D., M.L. Mobberley, and G.J. Schroepfer jr., Effects of MER-29 on the intermediary metabolism of cholesterol.
In: Progress in cardiovascular diseases. Proceedings of the conference on MER-29 (Triparanol), Princeton, New Jersey, December 16-17, 1959, edited by C.K. Friedberg, Vol.II, No.6 (Part I), 511-518, Grune and Stratton (New York) 1960.

Gardner, F.H., and E.W. Strauss, Disorders related to disturbed absorption of the small bowel.
Advances in internal medicine, Vol.X, 137-178, 1960.

Gould, R.G., Effects of MER-29 on sterol concentration in rat tissues and on cholesterol biosynthesis in vivo and in vitro from mevalonic acid-2-C^{14}.
In: Progress in cardiovascular diseases. Proceedings of the conference on MER-29 (Triparanol), Princeton, New Jersey, December 16-17, 1959, edited by C.K. Friedberg, Vol.II, No.6 (Part I), 492-503, Grune and Stratton (New York) 1960.

Haemmerli , U.P., Selektive intestinale Enzymdefekte mit Disaccharid- und Monosaccharid-Intoleranz.
Münchner medizinische Wochenschrift 1, 14-20, 1966.

Hayashi, M., The cytologic demonstration of N-acetyl-glucosaminidase employing naphthol-ASBI-N-acetyl-glucosaminide and hexazonium pararosanilin.
Journal of Histochemistry and Cytochemistry 13, 26, 1965.

Holt, S.J., E.E. Hobbiger, and G.L.C. Pavan, Preservation of integrity of rat tissues for cytochemical staining purposes.
Journal of Biophysical and Biochemical Cytology 7, 383-386, 1960.

van de Kamer, J.H., H.A. Weijers, and W.K. Dicke, Coeliac disease: IV An investigation into the injurious constituents of wheat in connection with their action on patients with coeliac disease.
Acta paediatrica (Stockholm) 42, 223-231, 1953.

Leckert, J.T., G.G. Mc Hardy, R. Mc Hardy, G.E. Welch, and H. Cradic, Clinical evaluation of MER-29 in the treatment of hypercholesterinemia associated with atherosclerosis.
In: Progress in cardiovascular diseases. Proceedings of the conference on MER-29 (Triparanol), Princeton, New Jersey, December 16-17, 1959, edited by C.K. Friedberg, Vol.II, No.6 (Part I), 571-575, Grune and Stratton (New York) 1960.

Lison, L., Histochimie et Cytochimie Animales.
Principes et Méthodes. Gauthier-Villars (Paris) 1953.

Mc Manus, J.F.A., Histological demonstration of mucin after periodic acid.
Nature (London) 158, 202, 1946.

Mc Pherson, J.R. and R.G. Shorter, Intestinal lesions associated with Triparanol (A clinical and experimental study).
American Journal of Digestive Diseases 10, 1024-1033, 1965.

- , W.H.J. Summerskill, An acute malabsorption syndrome with reversible mucosal atrophy.
Gastroenterology 44, 900-904, 1963.

Nachlas, M.M., D.T. Crawford, and A.M. Seligman, The histochemical demonstration of leucine aminopeptidase.
Journal of Histochemistry and Cytochemistry 5, 264-278, 1957.

- , K.C. Tsou, E. de Souza, C.S. Cheng, and A.M. Seligman, Cytochemical demonstration of succinic dehydrogenase by the use of a new p-nitrophenol substituted ditetrazole.
Journal of Histochemistry and Cytochemistry 5, 420-436, 1957.

Novikoff, A.B., Lysosomes in the physiology and pathology of cells. Contributions of staining methods.
In: Lysosomes (Ciba Foundation Symposium), 35-78, J. and A. Churchill (London) 1963.

- , S. Goldfischer, Nucleoside-diphosphatase acitivity in the golgiapparatus and its usefulness for the cytological studies.
Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (Washington) 47, 802-810, 1961.

Ottenjann, R., Die perorale Dünndarmbiopsie (Technik und diagnostische Bedeutung).
Münchner medizinische Wochenschrift 108/I, 31-39, 1966.

Padykula, H.A., E.W. Strauss, A.J. Ladman, and F.H. Gardner, A morphologic and histochemical analysis of the human jejunal epithelium in non tropical sprue.
Gastroenterology 40, 735-765, 1961.

Palay, S.L. and Karlin, L.J., An electron microscopic study of the intestinal villus (I).
Journal of Biophysical and Biochemical Cytology 5, 363-372, 1959.

Palopoli, F.P., Basic research leading to MER-29
In: Progress in cardiovascular diseases. Proceedings of the conference on MER-29 (Triparanol), Princeton, New Jersey, December 16-17, 1959, edited by C.K. Friedberg, Vol.II, No.6 (Part I), 519-523, Grune and Stratton (New York) 1960.

Pearse, A.G.E., Histochemistry. Theoretical and applied.
J. and A. Churchill (London) 1961.

Pugh, D. and P.G. Walker, Histochemical localization of ß-glucuronidase and N-acetyl-ß-glucosaminidase.
Journal of Histochemistry and Cytochemistry 9, 105-106, 1961.

Riecken, E.O. and A.G.E. Pearse, Demonstration of acid phosphatase acitivity in the golgi apparatus of the jejunal epithelium cell in patients with ideopathic steatorrhoea.
Histochemie 5, 182-184, 1965.

- , J.S. Stewart, C.C. Booth, and A.G.E. Pearse, A histochemical study on the role of lysosomal enzymes in idiopathic steatorrhoea before and during a gluten-free diet.
Gut (The Journal of the British society of Gastroenterology) 7, 317-332, 1966a.

- , J.S. Stewart, and R.H. Dowling, Neuere Methoden in der Diagnostik intestinaler Störungen.
Internist 7, 209-217, 1966b.

Romeis, B., Mikroskopische Technik.
Oldenbourg (München) 1948.

Todd, M.E., Effect of MER-29 on serum cholesterol and blood clotting mechanism: A plan of study and preliminary findings. II.
In: Progress in cardiovascular diseases. Proceedings of the conference on MER-29 (Triparanol), Princeton, New Jersey, December 16-17, 1959, edited by C.K. Friedberg, Vol. II, No. 6 (Part I), 555-562, Grune and Stratton (New York) 1960.

Wachstein, M. and Meisel, Histochemistry of hepatic phosphatases at a physiologic pH.
American Journal of Clinical Pathology 27, 13-23, 1957.

Wattiaux, R. and C. de Duve, Tissue fraction studies.
7. Release of bound hydrolases by means of Triton X-100*.
Biochemical Journal 63, 606-608, 1956.

Meine akademischen Lehrer waren die Herren Professoren und Dozenten

in Mainz: Berthold, Dabelow, Höhn, Kern, Klages, Kollath, Mislin, Lang, Laven, Schriever, Straßmann, Thews, Watzka.

in München: Bauer, Bodechtel, Büngeler, Dontenwill, Eder, Eyer, Forell, Georgii, v. Lanz, Leibbrand, Martius, Merté, Rudolph, Schirren, Schwiegk, Wielandt, Zenker.

in Marburg: Beckmann, Berendes, Bommer, Buchholz, Dölle, Exner, Gedigk, Hamm, Heuser, Hildebrandt, Jacob, Linneweh, Löhr, Martini, du Mesnil de Rochemont, Pots, Schiff, Schleyer, Schmid, Schwaiger, Siegert, Siess, Straub, Streicher.

Für die Überlassung des Themas danke ich
Herrn Dozenten Dr. med. W. Dölle und
Herrn Dr. med. E. O. Riecken.
Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Riecken,
der stets bereit war, mir Anregungen zu geben
und sachliche Hilfe zu gewähren.

Lebenslauf

Am 3. März 1942 wurde ich, Renate Rosenbaum, als Tochter des Franz Rosenbaum und seiner Ehefrau Hedwig, geborene Keil, in Reichenberg/Sudeten geboren. In Reichenberg lebte ich bis 1945. Von 1945 bis 1956 wohnte ich in Lautawerk/Niederlausitz. Seit 1956 ist mein Hauptwohnsitz in Wiesbaden-Biebrich.

Im Herbst 1948 kam ich in Lautawerk in die Grundschule, die ich bis Ostern 1956 besuchte. In Wiesbaden-Biebrich war ich ein Jahr auf der Mittelschule. Ostern 1957 kam ich auf die Helene-Lange-Schule in Wiesbaden, an der ich am 27. Februar 1962 die Reifeprüfung ablegte.

Mein Medizinstudium begann ich im Sommersemester 1962 an der Universität Mainz. Am 15. Oktober 1964 legte ich dort die ärztliche Vorprüfung ab. Im Wintersemester 1964/65 und im Sommersemester 1965 studierte ich in München. Vom Wintersemester 1965/66 bis zum Sommersemester 1967 studierte ich an der Universität Marburg. Meine Dissertation begann ich im Wintersemester 1965/66 in der Medizinischen Universitätsklinik in Marburg. Am 19. Dezember 1967 bestand ich in Marburg das medizinische Staatsexamen.